

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-074198

(43)Date of publication of application : 09.03.1992

(51)Int.Cl.

C07K 7/10
// A61K 37/24
A61K 37/24
C07K 99:00

(21)Application number : 02-186582

(71)Applicant : MATSUO TOSHIYUKI

(22)Date of filing : 13.07.1990

(72)Inventor : MATSUO TOSHIYUKI
SAGAWA KENJI
MINAMINO NAOTO

(54) SWINE DERIVED NEW PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE (CNP-53)

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A peptide having an amino acid sequence shown by the formula [(1) and (2), (3) and (4), (5) and (6), (7) and (8) and (9) and (10) are directly bonded and cysteine residues (Cys) at the 37-position and the 53-position form S-S bonds in the molecule].

USE: An antihypertensive agent and natriuretic.

PREPARATION: For example, swine brain is extracted, finely cut, treated with boiling water for 5 minutes, deactivated with protease, homogenized by a mixer, centrifuged, the supernatant liquid is collected, concentrated, mixed with acetone, formed precipitate is removed, the supernatant liquid is treated with a silica gel, adsorbed material is eluted, an eluted solution is concentrated, subjected to gel filtration and to treatment with a column having an immobilized antibody against atrial natriuretic peptide (ANP) and purified to give C-type natriuretic peptide (CNP).

8-Arg-Leu-Phe-Gly-Phe-Gly-Thr-Lys-Ser-Arg (1)
(2) Gly-Gly-Phe-Gly-Ser-Asp-Arg-Leu-Leu-Arg-Gly (2)
(3) Gly-Phe-Asp-Gly-Arg-Gly-Phe-Thr-Lys-Ser (3)
(4) Gly-Ser-Ileu-Lys-Arg-Gly-Leu-Ser-Lys-Gly (7)
(5) Gly-Phe-Gly-Leu-Lys-Lys-Arg-Arg-Tyr (8)
(6) Gly-Ser-Arg-Gly-Gly-Arg-Gly-Lys-Arg (9)
(7) Gly-Ser-Arg-Gly-Gly-Arg-Gly-Lys-Arg (10)

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 平4-74198

⑬ Int. Cl.⁸
C 07 K 7/10
// A 61 K 37/24
C 07 K 99:00

識別記号
ZNA
ABU
ACX

庁内整理番号
8318-4H
8317-4C
8317-4C

⑭ 公開 平成4年(1992)3月9日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全11頁)

⑮ 発明の名称 ブク由来新規生理活性ペプチド (CNP-53)

⑯ 特 願 平2-186582

⑰ 出 願 平2(1990)7月13日

⑱ 発 明 者 松 尾 壽 之 大阪府箕面市小野原東5丁目5-15-141
⑱ 発 明 者 寒 川 賢 治 宮崎県宮崎郡清武町加納甲1520番地の24
⑱ 発 明 者 南 野 直 人 大阪府吹田市香山台3丁目50, D-10-303
⑲ 出 願 人 松 尾 壽 之 大阪府箕面市小野原東5丁目5-15-141
⑲ 代 理 人 井理士 湯浅 恭三 外4名

明 細 書

1. (発明の名称)

ブク由来新規生理活性ペプチド (CNP-53)

2. (特許請求の範囲)

1. 下記のアミノ酸配列で表わされるペプチド。

E-Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Ter-Lys-Ser-Arg-(1)

(2) Ala-Ala-Tyr-Ala-Arg-Leu-Leu-His-Glu-(3)

(4) His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5)

(6) Gly-Asn-Lys-Lys-Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-(7)

(8) Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-(9)

(10) Gly-Ser-Met-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-OR

(式中、(1)と(2)、(3)と(4)、(5)と(6)、(7)と(8)、

(9)と(10)は直接結合しており、31位と33位のシ

ステイン残基(Cys)は分子内でS-S結合を形成

している。)

2. 下記のアミノ酸配列で表わされるペプチド。

X-Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-(1)

(2) Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Met-Ser-Gly-Ile-(3)

(4) Gly-Cys-OR

(式中、(1)と(2)、(3)と(4)は直接結合しており、6

位と22位とのシステイン残基(Cys)は分子内でS-S結合を形成しており、Xは次式

H-Val-Asp-Ter-Lys-Ser-Arg-(1')

(2') Ala-Ala-Tyr-Ala-Arg-Leu-Leu-His-Glu-(3')

(4') His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5')

(6') Gly-Asn-Lys-Lys-

H-Ser-Arg-(3')

(2') Ala-Ala-Tyr-Ala-Arg-Leu-Leu-His-Glu-(3')

(4') His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5')

(6') Gly-Asn-Lys-Lys-

H-Ala-Ala-Tyr-Ala-Arg-Leu-Leu-His-Glu-(3')

(4') His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5')

(6') Gly-Asn-Lys-Lys-

H-Leu-Leu-His-Glu-(3')

(4') His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5')

(6') Gly-Asn-Lys-Lys-

H-Tyr-Lys-Gly-Gly-Asn-Lys-Lys-。又は

H-Gly-Gly-Asn-Lys-Lys-

(式中、(1')と(2')、(3')と(4')、(5')と(6')は直接

結合しているものである。)で表わされるいずれかの

ペプチドである)。

3. (発明の詳細な説明)

発明の分類

本発明は、ブタ由来のANP (O-type atrio-retic peptide) に属する新規生理活性ペプチドに関し、特に特許には53個のアミノ酸残基から成るペプチド及びそのペプチド誘導体に関する。

発明の背景

近年、哺乳類の心房及び脳から、体液及び血圧の恒常性を調節しているホルモンとして、心房性ナトリウム利尿ペプチド (atrial natriuretic peptide: ANP) と脳ナトリウム利尿作用ペプチド (brain natriuretic peptide: BNP) と呼ばれる二種類のタイプの異なるペプチドホルモン類が発見され、その構造及び生理的機能が明らかにされたと共に、それらの生理作用についても明らかにされてきた。

ANP発見への最初の手がかりは、1981年 de Boldらにより提供された。すなわち、彼らはラット心房前庭神経を治のラットに移植すると著しい

から、 α -、 β -、 γ -ANPの生理的機能が判明した。これらはいずれも共通の前駆体タンパク質から生成されることになった (Giles, S. et al., Nature, 302, 724, 1984)。

なお、これらのANPのうち α -ANPが主に血中に分泌されていることが判っている。

α -ANPの構造が明らかにされて以来、現在までに他の哺乳類のANP構造も明らかにされてきている。この結果、ANPのアミノ酸配列は、げっ歯類からヒトまで哺乳類動物において広い範囲で類似しており、特に α -ANP (α -ANP) はヒト・イヌ・ブタを含む高等哺乳類においては同一のアミノ酸配列を持つこと、また、ラット及びウサギでは α -ANPの12位メチオニン残基がイソロイシン残基に置換している一箇所以外全く同一のアミノ酸配列を有していることが判ってきている (Giles, S. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 132, 852, 1985; Forrester, N. G. et al., Anat. Embryol., 152, 337, 1983)。

最初ANPは心房より単離されたが、ANPに

利尿を誘導することを見いだし、心房中にナトリウム利尿を促進する因子が存在していることを確認した (de Bold A. J. et al., Life Sci., 22, 83, 1981)。その後、この因子は藤川らによりヒト心房より単離、その構造が明らかにされ、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) と命名された。

(Kangawa, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 113, 151, 1983; Kangawa, K. et al., Nature, 312, 537, 1985)。ヒトANP (α -ANP) は心房において分子量の異なる二種類の、すなわち α -型、 β -型、および γ -型が存在しており、 α -型ANP (α -ANP) は分子内に1個の α -1-6結合を有した28個のアミノ酸からなる一本鎖ペプチドであること、 β -型ANP (β -ANP) は α -ANPが分子間で α -1-6結合を形成した逆平行二量体であること、 γ -型ANP (γ -ANP) は28個のアミノ酸からなる高分子量物質で、そのC-末端部分に α -ANPを含んでいることが明らかにされた。さらに、 α -ANPに類似する β -ANPが単離され、この解析

に対する抗体を構築し、生体内における分布を調べたところ、ANPは心臓以外にも脳にも存在していることが判った。脳では神経下垂、視床蓋 (positive tegmentum) にANP含有ニューロンの存在が報告されていることから (Castro, M. et al., Neurochemistry, 20, 113, 1984; Saper, C. B. et al., Science, 221, 1047, 1985)、ANPは現在脳において心血管系の調節にかかわる神経伝達物質としても作用しているのではないかと考えられている。

ANPの生理作用は前にも述べたが、顕著なナトリウム利尿作用を示すのみならず、血圧降下作用さらには脳腎皮質のアльдステロン産生を抑制することが判ってきた。従って、血中ANPは心臓から血中に分泌され、体液及び血圧の恒常性を調節するホルモンとして作用するのみならず、脳では神経系の神経伝達物質として作用し、体液及び血圧の恒常性を調節していることが判ってきた。

一方、BNPは1983年Sadoskyらによりブタ脳から単離・同定されたペプチドである (Sadosky, J.

et al., *Nature*, **222**, 78, (1969).
 Sedo により最初にブタ脳から単離された BNP (ペプチド-28) は分子内に 1 個の C-末端結合を持つアミノ酸残基よりなるペプチドであり、その構造、すなわちアミノ酸一次配列、及び C-末端結合 (アミノ酸残基で構成される環状構造) は ANP と似ているが、ANP とは明らかに異なるペプチドである。さらにこのペプチドは ANP と同様、ナトリウム利尿作用及び血圧降下作用を示すことが観察されたことから、このペプチドは脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP) と命名された。その後、ブタ脳から BNP-28 の C-末端に 10 個のアミノ酸が付加した BNP-38 残基からなる BNP-32 も単離され (Sedo, T., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 726, (1985)。さらにブタ心臓より A-BNP と命名されたアミノ酸 106 個からなるペプチドも単離・同定されている (Mitsui, K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **132**, 402, (1985))。これらの結果、これらの BNP ペプチド類は ANP

とほぼ全く同じった前駆体から合成されるに似ていた。さらに現在までにナトリウム利尿作用の C-末端が単離され、これらの BNP の前駆体構造も明らかになっている (Sedo, T., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1427, (1985; Kojima, S., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1423, (1985))。

前述したように、BNP は脳前駆体より単離されたが、ブタ脳において BNP は ANP に比べ 10 倍量存在していること、さらに ANP と同様心臓にも存在し (ただし、心臓での BNP の存在量は ANP の 2-3 倍)、心臓から血中へ分泌されていることが判った (Mitsui, K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 740, (1985; Kojima, S., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 872, (1985))。これらの事実から、BNP は ANP と同様、脳においては前駆体構造として、また心臓から血中へ分泌されるホルモンとして作用し、体液及び血圧の恒常性を調節していることが判った。

以上のことをめると、現在までのところ哺乳動物においては、少なくとも 2 タイプの異なる 2 種類の (ANP ファミリー、BNP ファミリー) のペプチド類が存在し、これらはいずれも心臓から血中へ分泌され、体液及び血圧の恒常性を調節するホルモンとして作用しているのみならず、これらの脳では合成され、前駆体の前駆体構造として作用し、体液及び血圧の恒常性を調節していることが判ってきた。

ところで、ナトリウム利尿ペプチドのように、体液にのみある生理的作用 (例えば、体液及び血圧の恒常性) の調節に単一ペプチドではなく、複数のペプチドが関与している例として、現在までにオビチスドペプチド (Oxid peptide)、タキチン (tachykinin) あるいはエンドセリン (endoselin) などが知られている。これらの例では、いずれも 2 種類の異なるペプチドファミリーが存在していることが知られている (Salt, I. S., *Trends Neuro Sci.*, **2**, 24, (1983; Kawanishi, S., *Physiol. Review*, **67**, 1217, (1987; Inoue, A., et al., *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U. S. A., **36**, 2823, (1959))。このことから、ナトリウム利尿作用を示すペプチドも現在までに知られている ANP、BNP ファミリー以外に他のファミリーに属するペプチド類が存在している可能性が持たれた。この点に鑑み、本発明者は、広く最近ブタ脳からナトリウム利尿ペプチドの第 3 のファミリーに属する前駆ペプチドを単離・同定することに成功し、このペプチドを CNP (C-type natriuretic peptide) と命名した (以後、本発明でこのペプチドを CNP-22 と略す)。CNP-22 はアミノ酸残基 22 個からなるペプチドで、ANP・BNP 同様分子内に 1 個の C-末端結合を持つ環状構造を形成している。この環状構造は ANP・BNP と同様 17 アミノ酸残基で構成されており、さらにこの環状構造を形成しているアミノ酸一次配列の相似性は CNP-22 と A-BNP・BNP-32 の間で高い。しかし、CNP-22 の C-末端部分の構造は ANP・BNP のそれとは大きく異なっている。すなわち、ANP・BNP の C-末端部分の構造は、環状構造

[illegible]

Abstract

卷之四 雜著

[illegible][illegible][illegible]

機要文書送達手帳

[illegible][illegible][illegible]

ばならない。さらに、本発明におけるペプチドが、CNP-22のN末端を含む53アミノ酸残基よりなるペプチドであるとするならば、本発明におけるペプチドの該CNP-22の残基数に対する1分子あたりの発現効率が、CNP-22のそれと同等である効果をよく説明することができる。

尚、このCNP-22においてエドマン法によって解明できなかったC末端部分の8個のアミノ酸残基については、CNP-53をコードするcDNAのクローニングにより確認された(第6図)、このクローニングに関しては発明者等の岡田出願の明細書に詳述した。

以上の事実により、本発明者は最終的に、本発明で製剤したペプチドの構造は以下のアミノ酸一次配列で示される新規ペプチドであると結論した。

H-Arg-Leu-Arg-Val-Arg-Thr-Lys-Ser-Arg-(1)
(2)Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-His-Gln-(3)
(4)His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5)
(6)Gly-Asn-Lys-Lys-Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-(7)

P-53は、ブタ脳においてただ単にCNP-22の前駆体ペプチドとして存在している可能性がある。しかし、本発明の実施例で示すように、ブタ脳におけるCNP-53の含量は、CNP-22より多く存在していることから、CNP-53はただ単にCNP-22の前駆体ペプチドとして脳内に存在しているだけでなく、CNP-53それ自身が直接脳内で神経や血管の伝達性を調節している可能性が高い。

CNP-53のペプチドのN末端から31個のアミノ酸のうち塩基性アミノ酸はプロセッシングを受け易い。従って、CNP-22のN末端に更にアミノ酸が付加した何種類かのペプチド誘導体が生成されるものと考えられる。

これらのペプチド誘導体としては下記のアミノ酸配列で表わされるペプチド類が含まれる。

1-Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-Lys-Phe-Gly-Leu-Lys-(1)
(2)Leu-Arg-Arg-Ile-Gly-Ser-His-Ser-Gly-Leu-(3)
(4)Gly-Cys-OR

(式中、(1)と(2)、(3)と(4)は直接結合しており、6

(3)Gly-Phe-Gly-Leu-Lys-Lys-Arg-Arg-Ile-(8)
(10)Gly-Ser-His-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-OR
(式中、(3)と(2)、(3)と(4)、(5)と(6)、(7)と(8)、
(9)と(10)は直接結合しており、37位と38位のシステイン残基(Cys)は分子内でS-S結合を形成している。)

なお、本明細書においてこのペプチドをCNP-53と称する。

CNP-53の構造は、第5図に示すように、C末端部分にCNP-22と同一のアミノ酸配列を持っている。言い換えれば、CNP-53は先に塩基・固定したCNP-22のN末端に31アミノ酸残基が付加したペプチドである。さらに、CNP-53のCNP-22に対応する部分のすくN末端部分(CNP-53の33位と34位)にLys-Lys配列が存在していることから(この配列は多くのペプチドホルモンの生合成において、前駆体タンパクから最終ペプチドホルモンが生ずる場合のプロセッシング酵素の認識及び切断部位であることが知られている)、本発明において塩基・固定したCNP

位と22位とのシステイン残基(Cys)は分子内でS-S結合を形成しており、Xは次式

H-Phe-Arg-Thr-Lys-Ser-Arg-(1)
(2)Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-His-Gln-(2')
(4)His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5')
(6)Gly-Asn-Lys-Lys-

H-Ser-Arg-(1')
(2')Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-His-Gln-(3')
(4')His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5')
(6')Gly-Asn-Lys-Lys-

H-Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-His-Gln-(3'')
(4'')His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5'')
(6'')Gly-Asn-Lys-Lys-

H-Leu-Leu-His-Gln-(3''')
(4''')His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5''')
(6''')Gly-Asn-Lys-Lys-

H-Tyr-Lys-Gly-Gly-Asn-Lys-Lys- 又は
H-Gly-Gly-Asn-Lys-Lys-

(式中、(1')と(2')、(3')と(4')、(5')と(6')は直接結合しているものとする)で表わされるい

たかのペプチドである)。

以上述べたように、本発明では、ブタの脳から抗CNP-22抗血清をも用いたR1A系を指標にC57ファミリーに属する新規ペプチドの単離・同定を行った結果、抗CNP-22抗血清に対し免疫活性を示すペプチドを、第一に純粋な状態まで精製することに成功し、さらにこのペプチドの構造解析を行ったところ、このペプチドがCNP-22をC-末端部分に含むミノ酸53残基よりなり利尿作用及びナトリウム利尿作用を有するペプチドであることを見だし、本発明を完成した。

以下、実施例により本発明を詳細に説明する。

実施例1. 抗CNP-22抗血清の作製及び

R1A系の構築

A. 抗CNP-22抗血清の作製

5mgの化学合成したCNP-22とウシ・サイログロブリン (thyroglobulin, シグマ社製) 15mgとを5mlの0.1Mリン酸バッファー(pH 7.4)に溶解し、この溶液に100μlの5%グルタルアルデヒドを加え、0度で30分間攪拌することにより、CNP-

(Tyr¹) CNP-22を逆相HPLCを用いて分離・単離した。

次に、このようにして作製した¹²⁵Iでラベルした(Tyr¹) CNP-22と実施例1. Aで作製した抗体(#171-4)を用いR1Aの系を以下に示す方法で構築した。

すなわち、R1A系のbufferは、86mM NaCl, 0.1M Tris-HCl, 102, 35mM EDTA, 0.05% NaN₃, 3.1% チキストロン T-40, 0.25% BSA (N-エチルマレイニミド(N-ethylmaleimide)処理したもの)を含む、50mMリン酸バッファー(pH 7.4)を用いた、スタンダードCNP-22溶液またはアッセイサンプル(100μl)と前記した方法で作製した抗体#171-4 (60000倍希釈したもの)を100μlを加え、4度で24時間反応する。24時間後、トレーサー(¹²⁵Iでラベルした(Tyr¹) CNP-22) 100μlを加え、4度で30時間反応した後、ポリエチレングリコールを加え、生じた沈殿のラジオアクティビティ(radioactivity)をgamma カウンター(GSC-600, Aloka)で測定した。

22をサイクログロブリンに結合させる。次に、この溶液を水(500μl)に対し5割、50mM NaClを含む50mMリン酸バッファー(pH 7.4) 500μlに対し2割透析することにより、反応液中の過剰の抗体を試薬を除いた。さらに、この反応液に80mM NaClを含む50mMリン酸バッファーを加え、全量を12割とした後、等量のFresenius コンプリートアジュバントを加えエマルジョンを形成し、これをウサギ(New Zealand White)に20日おきに繰り返し免疫することにより、抗CNP-22抗血清を得た。

なお、このようにして得た抗CNP-22抗血清は#171-4と命名した。

B. R1A系の構築

まず、(Tyr¹) CNP-22 (CNP-22のN-末端にタイロシン残基(Tyr)を付加したペプチド)を化学合成し、このN-末端Tyr残基にNiyataらの方法(Niyata, A. et al; Biochem. Biophys. Res. Commun., 123, 246-255, 1985)を用いて¹²⁵Iを導入し、¹²⁵Iでラベルされたantigen

このR1A系を用いると、1~100fmol/cubeのCNP-22が測定でき、抗体#171-4のα-A-NP、β-B-NP-22に対する交叉反応(cross-reactivity)は、それぞれ0.015%, 0.46%であった。

実施例2. CNP-22の単離・精製

ブタ430匹から40kgの脳を抽出し、切断した後、プロテアーゼを不活性化するために2容量の凍結水で5分間処理する。冷却後氷時温度を最終濃度が1Mになるように加え、この組織をポリトロンミキサーを用いてホモジナイズする。次に、このホモジネイトを遠心分離することにより、沈殿成分と上清成分に分け、この上清成分をcellulose acetate (PCAC #000-05, Millipore)を用いて精製する。この精製液にアセトンを加え(最終濃度65%)、生じた沈殿を遠心操作で除去し、上清を凍結乾燥した。ここで得られた凍結乾燥物を0.5M酢酸に溶かし、4割に分けてC-18リットゲルカラム(1.5g容量、LC-6000 SPH-C-003, Gynco)にカラムに吸着したペプチドを水・アセリノール(78:22)・15%トリフルオロ酢酸(TFA)が1~60%になる

るようにならせた状態で溶出し、この溶出液を濃縮することにより、乾燥重量26gのペプチドを含む溶液を得た。このうち1/2量を1M酢酸に溶かし、1M酢酸で平衡化したシリカゲル・セファックスC-10カラム(8×100cm, 3×35 μ m)を用いたイオン交換クロマトグラフィーにかけ、カラムに吸着したペプチドを1M酢酸、2Mピリジン及び2Mピリジン-酢酸(pH 5.0)を用いて順次溶出した。このようにして得られた各成分は、それぞれ、3F-1、3F-2、3F-3成分と名付け、凍結乾燥した。本発明におけるCNP-22の精製はこの3F-3成分を出発原料として用いた。なお、前記したB1Aの形で抗CNP-22血清に免疫反応を示すペプチドの成分とでは、この3F-3成分が含まれていることが判った。

まず、3F-3成分(乾燥重量5.2g)をセファックスC-10カラム(100cm, 7.5×145 μ m, フォルマリン)を用いたゲル濾過にかけることにより、分子重約1500~5000のペプチド含有成分を乾燥重

乾燥重量均配、流速)40ml/h、成分サイズ: 20 μ m/100 μ m)でさらに分離し、各溶出成分の抗CNP-22血清に対する免疫活性を測定した。この結果、第2図に示すように、フラクション番号93-102及び111-113に抗CNP-22血清に対する免疫活性が認められ、これらの成分をそれぞれ集めて凍結乾燥した。次に、前記C18-22クロマトのフラクション番号111-113の成分(乾燥重量8.5g)を抗-CNP-22抗体を用いたイムノアフェニティクロマトグラフィー(このカラムの作製に関しては本発明者等の報告に詳細に記載されている; Bada, S. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 143, 1055-1057, 1987)にかけ、カラムに吸着したペプチドを10% CH₃CNを含む1M酢酸溶液で溶出し、この溶出成分をC-18カラム(Ri-Pore RP-312, 4.6×250 μ m, Bio-Rad)を用いた逆相HPLC(流速: 1.5ml/min, 溶出液: H₂O:CH₃CN:10% TFA=(8):90:10:1, (3) 40:60:1(V/V), 溶出条件: 溶出液AとBを用いた直線濃度勾配、溶出時間: 120min)で分離・精製し、各溶出成分の抗CNP

22として2.95 μ gを得た。次に、この5.5半量(1.43g)をセファックスC-10カラム(100cm, 7.5×145 μ m, フォルマリン)を用い、さらに分離し、各溶出成分を前記したB1Aを用いて抗CNP-22血清に対する免疫活性を調べた。

この結果、第1図に示すように、抗CNP-22血清に対し免疫活性を示す成分が2つに別れ(第1図、分子重約4000~5000のB成分と分子重約2000~3000のC成分)。抗CNP-22血清に反応するペプチドの存在量はB成分とC成分で約4:3であった。なお、本発明者からより詳しく精製・測定した抗CNP-22はC成分に含まれていることが判っている。本発明ではこのB成分を以下に示す方法でさらに精製した。

まず、前記した方法で分離した分子重約4000~5000のB成分(乾燥重量740 μ g)をC18(C8-22, 2.4×82.3cm, Whatman)イオン交換クロマト(溶出液A: 10mM HCOOH, (pH 6.0):CH₃CN:90:10(V/V), 溶出液B: 0.5M HCOOH, (pH 6.0):CH₃CN:90:10(V/V), 溶出条件: 溶出液AとBを用いた

~22血清に対する免疫活性を調べた。

この結果、第3図の矢印に示す位置に、抗CNP-22血清に対し免疫活性を持つ、かつ210nmのUV吸収が最大値を示す成分が得られた。

本発明における精製ペプチド(CNP-22)の最終精製は、前記C-18カラムクロマトで分離した成分(第3図の矢印)をさらに、ジブフェニルカラム(219TP54, 4.6×250 μ m, Vydac)を用いた逆相HPLC(流速: 1ml/min, 溶出液: H₂O:CH₃CN:10:90:10:1, (3) 40:60:1(V/V), 溶出条件: 溶出液AとBを用いた直線濃度勾配、溶出時間: 120min)で分離・精製し、各溶出成分を抗CNP-22血清に対する免疫活性を調べた。この結果、第2図に示すごとく、CNP-22血清に対し免疫活性を示すペプチドを、単一ピークを示すまで精製することに成功し、このペプチドをCNP-22と命名した。

なお、本発明における精製で得られるCNP-22の収量は、ブタ脳40gから約135 μ mol(700 μ g)であった。

実施例3...CNP-53の構造決定

A. CNP-53のアミノ酸一次配列の解析

実施例2で得たCNP-53の3/4量(約525 ng)をアミノ酸配列自動分析機(Applied Biosystems 473A/126A)に供し、エドマン分解法によりアミノ酸一次配列を分析した結果、第4図に示す結果が得られ、この結果よりCNP-53のN-末端から45番目までのアミノ酸一次配列は以下に示す配列であると決定した。ただし、この解析で37サイクル目のF1H-アミノ酸は検出されないことから、本発明者は、このアミノ酸はロスチン残基と決定した。

- 8-Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Ile-Lys-Ser-Arg-(1)
 (2)Ala-Gly-Tyr-Ala-Arg-Leu-Leu-Gly-(3)
 (4)His-Pro-Asp-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5)
 (6)Gly-Asn-Lys-Lys-Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-(7)
 (8)Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-...
 (式中、(1)と(2)、(3)と(4)、(5)と(6)、及び(7)と(8)は直接結合している。)

なお、この解析で45サイクル目以後のF1H-ア

ミノ酸は検出することはできなかったが、決定するに至らなかった。

B. CNP-53のN-末端アミノ酸一次配列と

CNP-22のアミノ酸一次配列の相同性の比較

実施例2のAで決定したCNP-53のN-末端から45番目までのアミノ酸一次配列を、先に決定したCNP-22のアミノ酸一次配列と比較したところ、第5図に示すように、CNP-53の45番目から48番目までのアミノ酸一次配列は、CNP-22のN-末端から14番目までのアミノ酸一次配列に完全に一致することが判った。

C. CNP-53の遺伝子塩基配列の決定

(which region, please submit)

ヒヨコ塩基配列解析はCurrie等の方法(Currie et al., Nature, 221, 3-13, 1969)に従って決定した。このプロセスでCNP-53はCNP-22と同等な結果を示した。

D. CNP-53の抗CNP-22抗体血清に対する免疫反応性

実施例1で作成したR1A系を用い、CNP-

53の抗CNP-22抗体血清に対する1分子あたりの免疫反応を求めたところ、CNP-53の構造をCNP-22をC-末端に含む55個のアミノ酸残基からなるペプチドとして求めた値は、CNP-22のそれと同等であった。

以上の解析結果から、本発明者はCNP-53の構造は以下のアミノ酸一次配列で示される新規ペプチドであると結論した。

- 8-Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Ile-Lys-Ser-Arg-(1)
 (2)Ala-Gly-Tyr-Ala-Arg-Leu-Leu-Gly-(3)
 (4)His-Pro-Asp-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5)
 (6)Gly-Asn-Lys-Lys-Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-(7)
 (8)Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-(9)
 (10)Gly-Ser-His-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-81

(式中、(1)と(2)、(3)と(4)、(5)と(6)、(7)と(8)及び(9)と(10)は直接結合しており、37位と38位のロスチン残基(Cys)は分子内でS-S結合を形成している。)

発明の効果

以上のように、本発明では、まず先に単離・同

定したCNP-22の構造を特異的に認識する抗体を調製し、これを用いたR1A系を構築した。次に、このR1A系を陰性、ポジティブCNP-22以外のCNPファミリーに属する新規ペプチドを調製したところ、CNP-22とは異なる新規ペプチド(CNP-53)を唯一で特異的な抗体までに認識することに成功した。

さらに、このペプチドの構造解析を行い、CNP-53はCNP-22をC-末端に含むアミノ酸53個よりなるペプチドであることを明らかにし、このペプチドがCNPファミリーに属する新規ペプチドであることを裏付けた。

本発明により、CNP-53の構造が明らかになったことから、今後CNP-53は化学合成または遺伝子操作を用い、大量に入手することが可能になり、これを用いて種々の薬理試験を行うに当り、体内におけるCNP-53の生理的作用を明らかにすることが出来る。また、第5図に示すCNP-53のアミノ酸一次配列で1番目から32番目の間には、5個のリジン(Lys)残基(7, 24, 26, 30及び31番目)

[illegible]

[illegible][illegible]

格 组 别 分 类 表 示 于 下 列 各 表

[illegible][illegible][illegible]

そのアノノ第一状態から C M P - 12 のアノノ第一状態への状態遷移を示すものである。

[illegible]

姓名: 学号: 班级: 日期: 2019.12.12

◎ 讀 人 會 話 ◎

1992

図 2

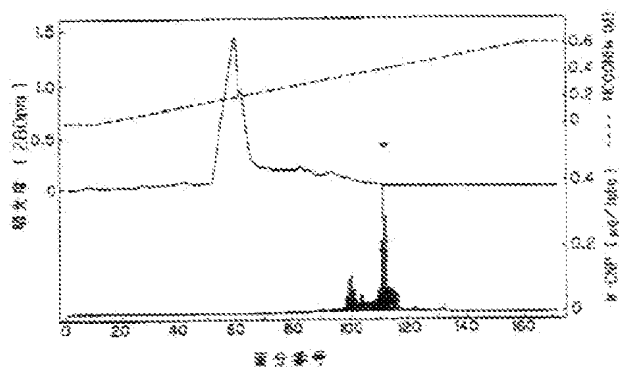


図 1

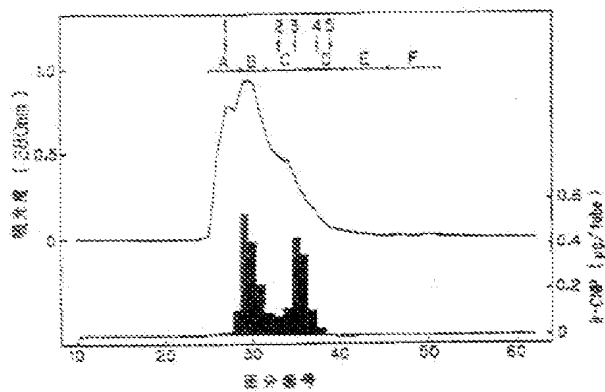


図 3

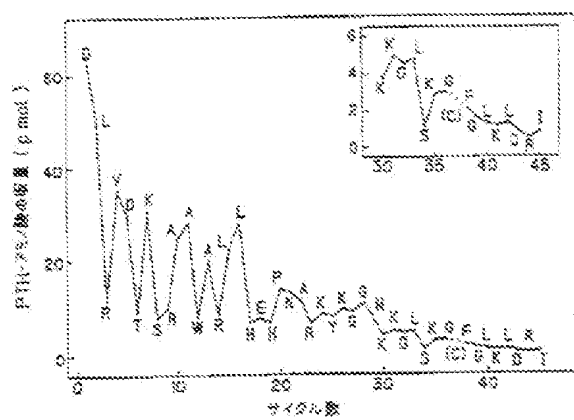
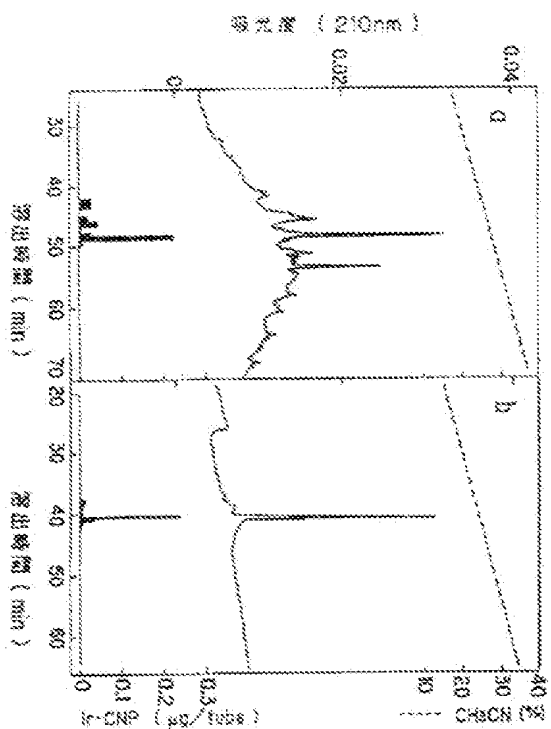
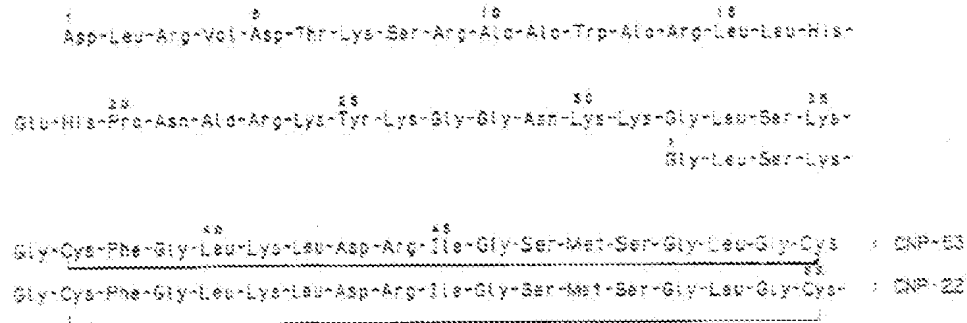


図 4



第 5 圖



第 6 圖

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----